

多様な生物を生きたまま電子顕微鏡観察する方法の開発

生物資源科学部 応用生物科学科

2年 松本 麻寛

2年 青塚 友哉

指導教員 生物資源科学部 応用生物科学科

准教授 尾崎 紀昭

1. 電子顕微鏡における生きたままのハエの観察

1.1 目的

本研究では、以下の二つを目的として行った。

1) 先行研究を踏まえてウジ(ハエ幼虫)でのナノスーツ形成能の検証

2) 蛹及び成虫はナノスーツ形成能をもつのか

【幼虫の観察】

1.2 方法

SEM用試料台にカーボン両面テープを貼り付け、その上にウジ(ハエ幼虫)を載せた。これを高真空SEM (HITACHI, SU8010) にセットし、加速電圧1.0kVで観察した。

1.3 結果と考察

未処理(生きたまま)のウジを高真空SEMで観察した結果、最初は動きが見られなかったが、次第に動く様子が観察された。その様子を動画撮影し代表例を図1に示した。その後、タッパー中で餌を与えて飼育したところ、蛹を経て成虫にまで正常に成長した。ウジは30分程度であれば高真空下でも生存可能であり、その後も通常のウジと遜色なく成長することが証明された。

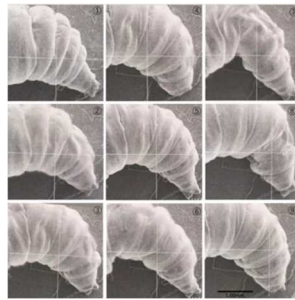


図1 ウジの動く様子

【蛹及び成虫の観察】

1.4 方法

SEM用資料台にカーボン両面テープを貼り付け、その上に試料を載せた。さらに、試料を固定するためにテープをベルトのようにして貼り付けた。蛹はSEM観察した個体を成長させて使用した。これを低真空SEM (HITACHI, TM3030Plus) にセットし、定電圧で観察した。また、成虫は死後に冷凍保存したものを使用した。

1.5 結果と考察

未処理の蛹を低真空SEMで観察したところ、図2のように観察できた。図2によると、蛹の表面はとげが並ぶ場所と縞模様がある場所があった。また、表面構造の一部分がチャージアップしていたが、観察は可能であった。そのため、ナノスーツ形成能は幼虫には劣るが、ある程度の真空耐性を保持していることが考えられる。

死後の成虫を冷凍保存したものを低真空SEMで観察したところ、図3、4のように観察された。図7によると、成虫の全身には体毛のようなものが見られ、その毛は太く長いものと細く短いものが観察された。また、図4は電子線の集中照射をして5分後の様子である。この照射によって複眼がダメージを受けたが、その他の部分には大きな変化は見られなかった。



図2 蛹の表面構造(50倍)

図3 成虫(40倍)

図4 成虫の集中照射後の様子(40倍)

1.6 まとめ及び将来展望

以上の結果により、ハエは幼虫、蛹、成虫のどの段階でもナノスーツ形成能を持つことが分かった。また、蛹と成虫は一部分がチャージアップしてしまったため、幼虫よりはナノスーツが薄いと考えられる。

今後、機会があれば生きたままの成虫の観察と、蛹及び成虫の高真空SEM観察を行いたい。また、ハエ以外にナノスーツ形成能を持つ昆虫を探し、同様に観察可能であるかを研究したい。

2. 電子顕微鏡におけるファージウイルスと緑膿菌の観察・撮影

2.1 目的

ナノスーツ法を用いると、従来の試料製法に比べて簡易かつ迅速に、生物を生きたままに近い状態で電子顕微鏡観察することが可能になる。そこで昨年度の学生自主研究の延長として、ナノスーツを用いてより小さい生物の電子顕微鏡画像を撮影したいと考えた。今回はファージウイルスが緑膿菌に感染、溶菌している瞬間のSEM写真の撮影を目的とし、そのために撮影に適した感染のタイミング、試料の作製方法などの観察方法を検討した。

2.2 方法

SEMにおけるファージウイルス感染済み緑膿菌の観察

①応用生物科学科の福島淳先生にご協力いただき、ファージウイルスと緑膿菌の培養液を作製した。②ファージウイルスと緑膿菌の培養液を混合し、放置した。③2%グルタルアルデヒドで固定した。④滅菌水で洗浄し、フィルターを用いて濾過した。⑤ナノスーツを加えて10分間放置した。⑥SEM観察を行った。⑦試料を蒸着したのち、約1週間後に再度観察を行った。⑧観察に適したファージウイルスの濃度、ファージウイルスと緑膿菌の接着時間、濾過方法など試

料の作製方法を検討した。

TEMにおけるファージウイルスの観察

生物資源科学部生物生産科学科の藤教授にご協力いただき、固定済みのファージウイルスをネガティブ染色後、TEMで観察した。

2.3 結果

SEMにおけるファージウイルス感染済み緑膿菌の観察

ナノスーツのみで観察するとチャージアップ（サンプルが帯電し適切な結果が得られない現象）が起こった。蒸着後1週間放置した試料を観察した際に、緑膿菌とファージウイルスと思われる粒子が観察できたが、接着した状態を見ることができなかった（図1）。また一部では壊れた緑膿菌も観察された（図2）。蒸着済みの試料をすぐに観察すると、緑膿菌とファージが接着した状態が観察できた。しかし緑膿菌が産生する膜小胞とファージウイルスの大きさが近似していたため、それらの判別が困難であった（図3）。観察した緑膿菌の表面にはへこみが見られた。今回、ファージウイルスのTEM観察ができなかった。

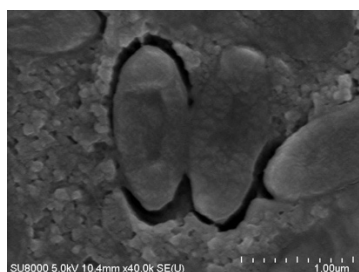


図1 緑膿菌とファージウイルス①

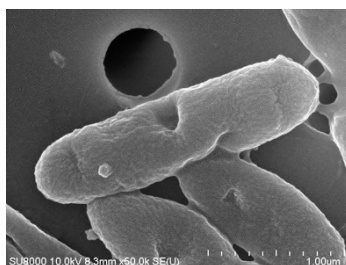


図2 緑膿菌とファージウイルス②

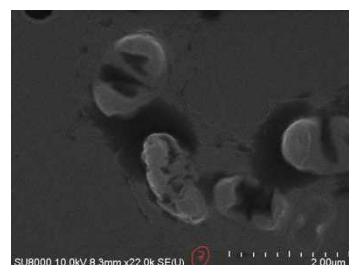


図3 壊れた緑膿菌

2.4 考察

ナノスーツのみで観察した際にチャージアップが起こったのは、濾過に用いたフィルターの孔に電子線がたまっただめだと考えられた。今回は蒸着することによって観察したが、考えられる対処法として以下のものがあげられる。

①フィルターを用いずに試料作製する方法を考える。

②ナノスーツ溶液を濾過することによって、孔も含めたフィルター全体をスーツで覆う。

蒸着後1週間後に観察した際に緑膿菌とファージウイルスが離れた状態だったのは、長期間放置したことによって緑膿菌の中の水分が失われ、試料が収縮したためだと考えられる。また壊れた緑膿菌が観察されたことから、ナノスーツは試料作成に要する時間が短くすぐに観察できるメリットがある一方で、一定時間を経過すると試料が乾燥してしまうデメリットがあることが判明した。緑膿菌にへこみが見られたのは、高真空条件による影響だと考えられる。

2.5 まとめと将来展望

ファージウイルスが緑膿菌に接着している状態を観察することができたが、溶菌しているところを観察することができなかった。ファージウイルスと緑膿菌の接着の時間、または撮影のタイミングを変えることによって、経時的な変化を観察することができると思う。

3. 共焦点レーザー顕微鏡を用いた緑膿菌の膜小胞とファージウイルスの判別

3.1 背景・目的

走査型電子顕微鏡において緑膿菌とファージウイルスを観察した際に、緑膿菌が産生する膜小胞とファージウイルスの判別が困難であることが分かった。そこで膜小胞とファージウイルスを区別して観察するために、共焦点レーザー顕微鏡を用いる方法を試みることにした。

3.2 方法

①ファージウイルスと緑膿菌の培養液を混合し10分間放置した。②グルタルアルデヒドで固定した。③緑膿菌のDNAとファージウイルスのDNAをSYBR Green I（緑色蛍光）で、緑膿菌の脂質をFM4-64（赤色蛍光）を加え、暗所で15分間染色した。④退色防止剤であるSlowfade Goldを添加し、共焦点レーザー顕微鏡（NIKON AXR）で観察した。

3.3 結果

フィルター濾過によって試料作製すると像がぼやけてしまったが、遠心分離によって試料作製するとよりはっきり観察することができた。また水分が多すぎると観察対象が動いて像がぼけてしまったが、二晩乾燥させてから観察するとより明瞭な像を観察することができた。緑膿菌とファージウイルスそれぞれを個別に観察することができたが、両者を同時に観察することはできなかった。

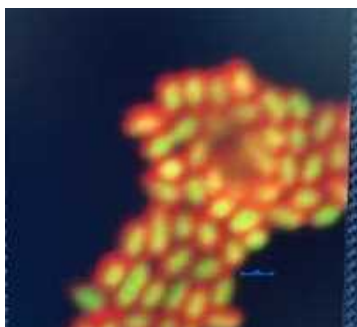


図1 緑膿菌（脂質：赤、DNA：緑）



図2 ファージウイルス（DNA：緑）

3.4 考察

フィルター濾過によって作製した試料の像がぼけてしまったのは試料が発した光を試料フィルターが吸収、反射することで像がぼけてしまったと考えられる。また試料をしっかりと乾燥させることによってはっきりとした像を観察できたが、乾燥による形状変化が生じてしまった可能性がある。緑膿菌とファージウイルスが同時に観察できなかったのは、ファージは緑膿菌に比べて粒径が極めて小さく、相対的に蛍光が微弱になるためだと考えられる。同じ波長で観察するためには、ファージの蛍光を強くする、またはファージの殻タンパク質に特異的に結合する抗体を異なる蛍光色素で標識して区別する方法などが考えられる。

3.5 まとめと将来展望

ファージウイルスと緑膿菌を同時に観察することができなかったが、もし同時観察が可能になればファージが緑膿菌に感染してから緑膿菌が溶菌するまでを視覚的に追跡、理解することが可能になると考える。

謝辞

本研究を遂行するにあたり、試料のご提供と観察にご協力いただいた、応用生物科学科教授・福島淳先生と生物生産科学科教授・藤晋一先生に感謝申し上げます。